AMEA-nın Xəbərləri (biologiya elmləri), cild 66, №3, səh. 91-96 (2011)

# Активность Ключевых Ферментов Фотосинтеза у $C_3$- и $C_4$-Растений в Условиях Водного Стресса

**У.А. Мехвалиева*, Г.Г. Бабаев, М.Н. Алиева, Н.М. Гулиев**
*Институт ботаники НАНА, AZ1073, Патамдарское шоссе 40, Баку, Азербайджан*

**Исследовали активность некоторых ключевых ферментов углеродного метаболизма карбоангидразы, РБФ - карбоксилазы, ФЕП - карбоксилазы и НАДФ-малатдегидрогеназы в начальных периодах вегетации у $C_3$- и $C_4$-растений, в условиях оптимальной водообеспеченности и недостатка влаги в почве. Установлено, что ключевые ферменты $C_4$ - фотосинтеза ФЕП - карбоксилаза и НАДФ –малатдегидрогеназа более стабильны при водном стрессе в листьях амаранта, чем ферменты цикла Кальвина. Однако в листьях пшеницы ферменты цикла Кальвина -РБФ-карбоксилаза и карбоангидраза оказались более стабильными при водном стрессе по сравнению с ферментами $C_4$ - цикла.**

*Ключевые слова*: пшеница, амарант, карбоангидраза, ФЕП - карбоксилаза, РБФ – карбоксилаза, НАДФ – малатдегидрогеназа, водный стресс

## ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что характер взаимосвязи между интенсивностью фотосинтеза, уровнем водообмена и углеродного метаболизма меняется под влиянием факторов среды. Природа первичных продуктов, а также активность ферментов фотосинтетического метаболизма углерода в растениях зависит от напряженности водного стресса (Тарчевский, 1964).

В ответ на действие стрессоров: NaCl и засухи в растительном организме происходят значительные изменения, направленные на нейтрализацию осмотических и токсических эффектов. К ним относятся изменение ионной проницаемости мембран, интенсификация энергетического обмена (Головко, 1999), интеграция углеродного и азотного метаболизма (Кафи и др., 2003).

В такой ситуации наибольший адаптационный потенциал имеют растения, относящиеся к $C_4$-типу (кукуруза, сорго, амарант и др.), для которых характерна более сложная морфофизиологическая структура и лучшая приспособленность к условиям современной окружающей среды по сравнению с $C_3$-растениями (Воронин и др., 1995; Алехина и др., 2005).

При выращивании растений в одинаковых условиях, но при различной влажности воздуха эффективность использования воды и продуктивность выше у $C_4$-видов по сравнению с $C_3$-видами (Rawson et al., 1977). Высокая эффективность использования воды $C_4$-видами, по мнению некоторых авторов (Acita Shigami, Moss, 1972), объясняется большей чувствительностью их устьичного аппарата к изменению окружающей среды. В полевых условиях у растений с $C_4$-фотосинтезом наблюдалось повышение интенсивности фотосинтеза при более низкой интенсивности транспирации, что способствовало эффективному использованию воды на образование сухой массы.

Преимущества $C_4$-растений перед $C_3$-растениями особенно проявляются в условиях неблагоприятного воздействия внешних факторов (Grimvade, 1977). Возможно, что это связано с кооперативным механизмом усвоения $CO_2$ и более широким диапазоном приспособлений $C_4$-растений к условиям среды. Тип фотосинтетической фиксации $CO_2$ влияет на распространение видов, поскольку он является одним из важнейших признаков растений: в условиях недостатка влаги и повышенных температур преобладают $C_4$-виды (Vogel et al., 1986).

При почвенной засухе замедляется синтез сахарозы и белка, происходит распад высокомолекулярных соединений, увеличивается содержание пролина, повышается активность многих ферментных систем. Вследствие чего накапливаются свободные аминокислоты, что объясняется подавлением образования АТФ в хлоропластах (Тарчевский, 1964).

До сих пор механизмы регуляции активности ферментов фотосинтеза у $C_3$- и $C_4$-растений в стрессовых условиях освещены недостаточно, хотя они играют важную роль в продукционном процессе и непосредственно влияют на соотношение между синтезом и гидролизом органических соединений (Бальнокин и др., 2005; Pierre, 2004).

Высказано предположение, что активность ферментов углеродного метаболизма, в частно-

*E-mail: ulduza-m@rambler.ru

сти, рибулозобисфосфаткарбоксилазы и возможно, НАДФ - специфичной дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида, может быть использована в качестве критерия для оценки активности фотосинтетического аппарата при селекции и отборе высокопродуктивных сортов (Андреева, Авдеева, 1976). Физиологическим объяснением этого факта может служить то, что амарант принадлежит к растениям с $C_4$-путем фотосинтеза. Основываясь на этих замечательных фактах, мы выбрали амарант как модельное растение для изучения механизмов засухоустойчивости растений.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния недостатка влаги на активность некоторых ключевых ферментов фотосинтеза: рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РБФК, КФ 4.1.1.39), фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПК, КФ 4.1.1.31), НАДФ - малатдегидрогеназы (НАДФ - МДГ, КФ 1.1.1.82) и карбоангидразы (КА, КФ 4.2.1.1) из листьев амаранта и пшеницы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили сорт пшеницы Баракатли-95 ($C_3$-растение) и амаранта багряного (*Amaranthus cruentus* L.) ($C_4$-растение). Пшеница была выращена в полевых условиях на экспериментальной базе НИИ Земледелия, расположенной на Апшеронском полуострове. В одном варианте растения нормально обеспечивали водой до конца онтогенеза, а в другом варианте, в фазе выхода в трубку, искусственно создавали засуху.

Щирица (*Amaranthus)* относится к аспартатным $C_4$-растениям, которые, как известно, обладают высокой интенсивностью фотосинтеза, большей эффективностью углеродного и азотного обмена и, как следствие, повышенной продуктивностью по сравнению с растениями $C_3$- и САМ групп. Растения амаранта выращивали в почве в вегетационных сосудах, в климатической камере фитотрона при температуре 30-35$^0$С под люминесцентными лампами ЛБ-40 при освещенности 40-50 клюкс, фотопериоде 16 ч, влажности 60-70%, что соответствует интенсивности энергии около 55-65 Вт/м$^2$. Контрольные растения в течение вегетации находились в оптимальных условиях водообеспечения при влажности почвы 60% от полной ее влагоемкости. Опытные растения пшеницы и амаранта подвергали водному стрессу. При этом полив сосудов прекращали, и влажность почвы доводили до 30% полной ее влагоемкости. Первую пробу брали 5 дней после прекращения полива.

Для анализа использовали листья растений пшеницы и амаранта. Для каждой обработки были взяты три различных образца, и они были проанализированы дважды. Листья были измельчены с помощью гомогенизатора типа Waring blender (Объединенное Королевство) при полной скорости четыре раза по 30 секунд с перерывом 30 секунд при температуре +4$^0$С. Полученные экстракты использовали для измерения активности ферментов.

Активность РБФК и ФЕПК измеряли спектрофотометрическим методом (Романова, 1980).

Активность НАДФ-МДГ измеряли спектрофотометрическим методом (Scheibe, Stitt, 1988). Активность КА определяли электрометрическим путем (Wilbur, Anderson, 1948). Определения оводненности, относительного содержания воды (ОСВ) и водного дефицита (ВД) листьев проводили высушиванием образцов при 105$^o$С (Викторов, 1983; Tambussi et al., 2005). Содержание хлорофиллов определяли по методу Sims and Gamon (Sims, Gamon, 2002). Количество общего белка в листьях определяли по Sedmak (Sedmak, Grossberg, 1977). Результаты экспериментов обработаны статистически.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У орошаемых и подвергнутых водному дефициту растений наблюдались существенные различия в ОСВ и ВД. У растений, выращенных при нормальном водообеспечении, ОСВ в листьях растений амаранта и пшеницы значительно различаются в широких пределах (таблица 1).

Как показано в таблице 1, в листьях амаранта ОСВ в начальных периодах засухи (пятый день засухи) уменьшилось на 10% по сравнению с нормально орошаемыми растениями.Этот показатель в листьях пшеницы увеличивался до 15% по сравнению с нормально орошаемыми растениями. При засухе (десятый день засухи) значение ОСВ в листьях амаранта почти не менялось, в то время как в пшеничных листьях увеличивалось до 19%. Величина потери воды у амаранта во время засухи была незначительной. У этого растения после стресса ОСВ понизилось от 83,9 % до 75,84 %, а у пшеницы от 65,2% до 46,1%.

Как показано в таблице, уровень ВД в листьях амаранта в течение засухи увеличивался незначительно. Интересно было отметить, что в отличие от $C_4$-растения амаранта в листьях $C_3$-растения пшеницы уровень повышения ВД в ходе засухи менялся в интервале 14-19%.

**Таблица 1.** Влияние засухи на оводненность, ОСВ, ВД, содержание общего белка (% на сухую массу) и количество хлорофиллов (мкг/мл) в листьях пшеницы и амаранта

| Культура | Варианты | Оводненность листьев % | ОСВ % | ВД % | Общий белок мг/г | Хл *a* *µг/мл* | Хл *b* *µг/мл* | Хл *a+b* | Хл *a/b* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Пятый день засухи | | | | | | | | | |
| Амарант | Контроль | 83,90±0,17 | 80,1 | 20,4 | 1,91 | 4,39 | 0,32 | 4,71 | 13,5 |
| | Опыт | 75,84±0,24 | 73,8 | 22,2 | 2,23 | 4,03 | 0,55 | 4,58 | 7,32 |
| Пшеница | Контроль | 84,67±0,16 | 65,2 | 29,0 | 3,71 | 8,25 | 2,43 | 10,68 | 3,34 |
| | Опыт | 83,36±0,29 | 46,1 | 43,0 | 4,32 | 5,29 | 2,66 | 7,95 | 1,93 |
| Десятый день засухи | | | | | | | | | |
| Амарант | Контроль | 79,19±0,01 | 69,3 | 26,7 | 1,81 | 3,58 | 2,75 | 6,33 | 1.31 |
| | Опыт | 76,66±0,01 | 60,7 | 30,1 | 1,86 | 2,25 | 2,11 | 4,36 | 1,12 |
| Пшеница | Контроль | 86,21±0,05 | 65,2 | 30,3 | 4,08 | 10,4 | 6,33 | 16,73 | 1,63 |
| | Опыт | 83,19±0,01 | 46,1 | 49,8 | 3,63 | 7,81 | 7,87 | 15,68 | 0,99 |

Общее содержание хлорофилла и отношение Хл *a/b* уменьшается во время засухи. У устойчивого растения амаранта особые изменения не выявлены, так как данные параметры статистически стабильны, в то время как у пшеницы обнаружены значительные уменьшения (таблица 1). Уменьшение содержания пигментов, вызванное засухой было описано и ранее для некоторых видов растений, включая горох (Moran et al., 1994) и твёрдую пшеницу (Loggini et al., 1999).

Активность основных ферментов $C_4$-фотосинтеза - ФЕПК и НАДФ - МДГ у амаранта в условиях водного стресса была выше, чем в контроле (рисунок), а активность РБФК - одного из ферментов цикла Кальвина изменялась незначительно. В листьях пшеницы активность РБФК при низком содержании белка в условиях недостаточного водоснабжения заметно снижалась, а активность ФЕПК и НАДФ - МДГ находилась на уровне контроля. Следовательно, генетически обусловленная способность к адаптации $C_4$ - растений амаранта в жарких и засушливых регионах связана с активностью ферментов углеродного метаболизма ФЕПК и НАДФ - МДГ.

Ранее нами установлена возможность индукции синтеза ферментов $C_4$ - фотосинтеза (ФЕПК и НАДФ - МДГ) светом различной интенсивности и высокой температурой при становлении фотосинтетического аппарата листа амаранта (Babayev, неопубликованные данные). Имеются также данные о том, что при достаточной активности ФЕПК могут образовываться $C_4$ - дикарбоновые кислоты - яблочная и аспарагиновая (Чиков, 1987; Pierre et al., 2004). Вероятно, повышение активности ФЕПК и НАДФ - МДГ у амаранта в условиях водного стресса увеличивает образование $C_4$-кислот. Последние обеспечивают цикл Кальвина углекислотой в условиях засухи, когда газообмен снижен из-за увеличения устьичного сопротивления (Магомедов и др., 1980). По аналогии с $C_4$ - растениями можно допустить наличие подобного механизма выживания при водном стрессе и у $C_3$ - растений.

Сравнивая, общее количество белка и хлорофиллов с водными показателями и изменениями активности ферментов метаболизма углерода, мы можем предположить, что в отношение воды, в метаболизме $C_3$- и $C_4$ - растений, особенно, в ходе фотосинтеза происходят адаптационные процессы для выживания самого растения.

Известно, что активность ферментов может повышаться в результате изменения конформации их молекул, активации латентных форм, сдвигов в соотношении активаторов и ингибиторов, уменьшения скорости распада и, наконец, в результате синтеза энзиматических белков (Хавкин, 1969).

Как видно из рисунка активность РБФК выше у контрольных растений пшеницы, чем у амаранта. Это может быть связано с тем, что количество РБФК меньше в $C_4$-, чем в $C_3$-растениях (Андреева и др., 1972; Магомедов и др., 1980; Vogel et al., 1986).

НАДФ-МДГ катализирует декарбоксилирование малата с образованием пирувата, НАДФН и $CO_2$. Все образовавшиеся в реакции продукты играют важную роль в метаболизме. Пируват относится к немногочисленным метаболитам обмена, которые занимают центральное положение в биохимических превращениях. Он может легко включиться в цикл Кребса и использоваться как в качестве источника энергии, так и исходного вещества для синтеза органических компонентов клетки. Он также может переходить обратно в цитоплазму и использоваться при восстановлении ФЕП. НАДФН является высокоэнергетическим универсальным редуцирующим агентом (Backhausen et al., 1994; Foyer et al., 1992).

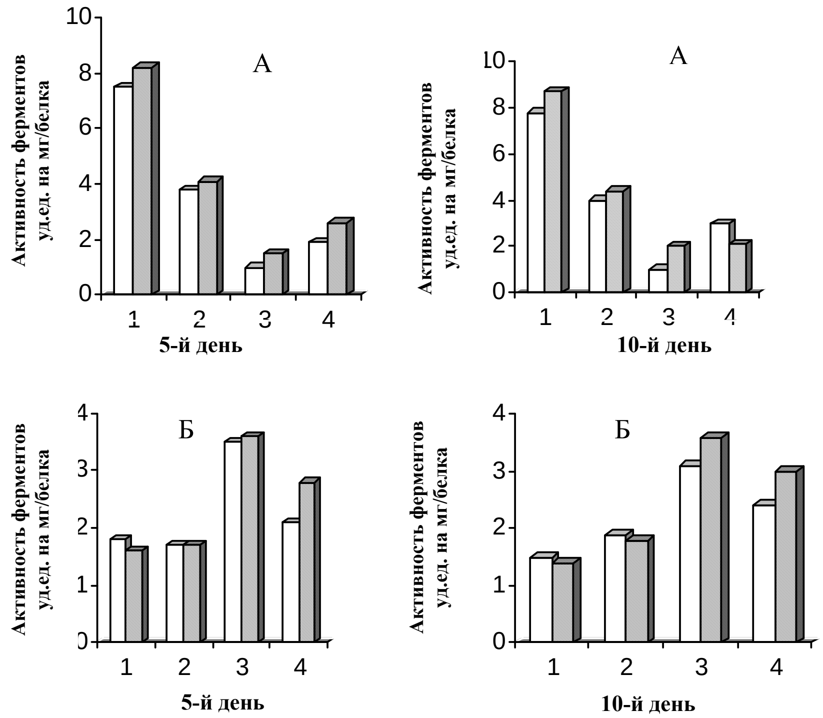



**Рис. 1.** Активность ферментов ФЕПК (1), НАДФ-МДГ (2), РБФК (3) и КА (4) у амаранта (А) и пшеницы (Б) в условиях водного стресса.

Активность ферментов углеродного метаболизма в значительной степени обусловлена водным балансом ассимиляционной ткани и процессом синтеза азотсодержащих веществ. В начале обезвоживания наибольшее снижение оводненности выявлено у амаранта (таблица). Затем в результате адаптации разница по содержанию воды в листьях растений, обеспеченных влагой и подвергаемых почвенной засухе, уменьшалась. В листьях амаранта и пшеницы содержание общего белка в первый срок определения несколько увеличилось, с нарастанием обезвоживания оно снижалось в большей степени у пшеницы, хотя абсолютные значения были выше, чем у других культур. Именно это могло обусловить отсутствие значительных различий в активности изученных ферментов у пшеницы, выращиваемой при оптимальной водообеспеченности и без полива (Табл. 1 и Рис. 1).

Таким образом, сравнительное исследование активности ферментов фотосинтетической ассимиляции $CO_2$ в листьях растений различных экологических групп позволяет сделать вывод о том, что ключевые ферменты $C_4$ – фотосинтеза - ФЕПК и НАДФ - МДГ более стабильны в условиях недостаточной водообеспеченности, чем ферменты цикла Кальвина (РБФК), что, вероятно, способствует высокой устойчивости $C_4$ - растений к водному стрессу. Также сделан ввод о том, что водный баланс, количество белка и содержания хлорофилла активно участвуют в процессе проявления адаптации у высших растений при засухе. На фоне этой адаптации меняется активная реакция растений, связанная с фотосинтетической ассимиляцией $CO_2$ и метаболизмом фиксации азота.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

**Андреева Т.Ф., Авдеева Т.А.** (1976) Адаптация фотосинтеза $C_3$- и $C_4$-растений к условиям внешней среды. Физиол. и биохим. Культ. Раст. **3( 8):** 236-240.

**Андреева Т.Ф., Авдеева Т.А., Майорова О.И.** (1972) Теоретические основы фотосинтетической продуктивности. М., Наука: 219-224.

**Алехина Н.Д., Бальнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В., Мейчик Н.Р., Носов А.М., Полеская О.Г., Харитонашвилли Е.В., Чуб В.В.** (2005) Физиол. раст. М., Академия: 640 с.

**Babayev H.Q.** (2007) Quraqlıq stresi zamanı bəzi birləpəli və ikiləpəli $C_3$- və $C_4$-bitkilərin ontogenezində karbon metabolizmi fermentlərinin müqaisəli tədqiqi. Azərbaycan MEA Botanika İnstitutunun əsərləri. **XXVII:** 240-244.

**Бальнокин Ю.В., Котов А.А., Мясоедов Н.А., Хайлова Г.Ф., Куркова Е.Б., Луньков Р.В., Котова Л.М.** (2005) Участие дальнего транспорта $Na^+$ в поддержании градиента водного потенциала в системе среда-корень-лист у галофита *Suaeda altissima*. Физ. рас. под ред. Ермакова И.П.М., Изд. центр Академия: 27-34.

**Викторов Д.П.** (1983) Малый практикум по физиололгии растений. М., Высш. шк.: 135 с.

**Воронин П.Ю., Манжулин А.В., Мясоедов Н.А., Бальнокин Ю.В., Терентьева Е.И.** (1995) Морфологический тип и фотосинтетическая функция листьев $C_4$-растений при длительном засолении почвы. Физиол. раст. **42:** 356-367.

**Головко Т.К**. (1999) Дыхание растений (физиологические аспекты). С.-Пб., Наука: 204 с.

**Магомедов И.М., Тищенко Н.Н., Юзбеков А.К.** (1980) Тр. по прикл. Ботанике, генетике и селекции ВНИИ растениеводства. **2(67):** 100-106.

**Кафи М., Стюарт В.С., Борланд А.** (2003) Содержание углеводов и пролина в листьях, корнях и апексах сортов пшеницы, устойчивых и чувствительных к засолению. Физиол. раст. **50(2):** 174-182.

**Романова А.К.** (1980) Биохим. методы изуч. автотроф у микроор-ов. М., Наука: 157 с.

**Тарчевский И.А.** (1964) Фотосинтез и засуха. Казань, Изд-во Казан ун-та: 197 с.

**Хавкин Е.А.** (1969) Индуцированный синтез ферментов в процессе роста и морфогенеза растений. М., Наука: 168 с.

**Чиков В.И.** (1987) Фотосинтез и транспорт ассимилятов. М., Наука: 188 с.

**Acita Shigami, Moss D.M.** (1972) Differential stomatal response between $C_3$- и $C_4$-species to atmospheric $CO_2$ concentration and light. Crop Sci. **12 (6):** 789-793.

**Backhausen J.E., Kitzmann C., Scheibe R.** (1994) Competition between electron acceptors in photosynthesis: regulation of the malate valve during $CO_2$ fixation and nitrite reduction. Photosyn. Research. **42:** 75-78.

**Loggini B., Scartazza A., Brugnoli E. (**1999) Antioxidative defence system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Plant Physiol. **119:** 1091-1098.

**Moran J.F., Becana M., Iturbe-Ormaetyl I., Frechilla S., Klucas R.V., Aparicio-Tejo P.** (1994) Drought induces oxidative stress in Pea plants. Planta **194**: 346-352.

**Foyer C.H., Lelandais M., Harbinson J.** (1992) Control of the quantum efficiencies of photosystem-I and photosystem-II, electron flow, and enzyme activation following dark-to-light transitions in pea leaves-relationship between NADPINADPH ratios and NADP-malate dehydrogenase activation state. Plant Physiol. **99:** 979-986.

**Pierre J.-N., Prieto J.-L., Gadal P., Vidal J.** (2004) *In situ* phospho*enol*pyruvate carboxylase activity and kinetic properties in isolated *Digitaria sanguinalis* mesophyll cells. Photosynth. Res. **79:** 349–355.

**Tambussi E.A., Nogues S. and Araus J.L.** (2005) Ear of durum wheat under water stress: water relations and photosynthetic metabolism. Planta **19:** 1-25.

**Sedmak J.J., Grossberg S.E.** (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie Brilliant Blue G-250. Annal. Biochem. **79:** 544-552.

**Scheibe R., Stitt M.** (1988) Comparsion of NADP-malate dehydrogenase activation, QA reduction and $O_2$ evolution in spinach leaves. Plant Physiol Biochem. **26:** 473-481.

**Sims D.A., Gamon J.A.** (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote Sensing of Environ. **81:** 337-354.

**Grimwade S.** (1977) Carbon fixation pathways. Nature **269(5625):** 201-212.

**Rawson H.M., Begg J.E., Woodward R.G.** (1977) The effect of atmospheric humidity of photosynthesis, transpiration and water use efficiency of leaves of several plant species Planta **134(1):** 5-10.

**Vogel J.C., Fuls A., Danin A.** (1986) Geographical and environmental distribution of $C_3$ and $C_4$ grasses in the Sinai, Negev, and Judean deserts. Oecoloia **70(2):** 258-265.

**Wilbur K.M., Anderson N.G.** (1948) Electrometric and colometric determination of carbonic anhydrase. J. Biol. Chem. **176:** 147-151.

**U.Ə. Mehvalıyeva, H.Q. Babayev, M. N. Əliyeva, N.M. Quliyev**

**Su Stresi Şəraitində $C_3$- və $C_4$-Bitkilərdə Fotosintezin Açar Fermentlərinin Aktivliyi**

Optimal su təminatı və torpaq quraqlığı şəraitində becərilmiş bəzi $C_3$- və $C_4$- bitkilərində vegetasiyasının ilkin mərhələlərində karbon metabolizminin açar fermentləri olan RBF-karboksilaza, FEP-karboksilaza və NADF-malatdehidrogenazanın aktivliyi tədqiq olunmuşdur. Müəyyən olunmuşdur ki, $C_4$-fotosintezin açar fermentləri FEP-karboksilaza və NADF-malatdehidrogenaza uzunmüddətli su stresi zamanı amarant yarpaqlarında Kalvin tsikli fermentlərinə nisbətən daha davamlı olur. Əksinə, buğda yarpaqlarında su stresi zamanı Kalvin tsiklinin fermenti olan RBF-karboksilaza və karboanhidraza $C_4$-tsiklin fermentlərinə nisbətən daha çox stabil olurlar.

**U.A. Mehvaliyeva, H.G. Babayev, M.N. Aliyeva, N.M. Guliyev**

**The Activity of Key Enzymes of Photosynthesis in $C_3$- and $C_4$-Plants under Conditions of Water Stress**

The activity of key enzymes of carbon metabolism- RBP-carboxylase, PEP-carboxylase, NADP-malate dehydrogenase was studied during primary periods of vegetation in $C_3$- and $C_4$-plants under conditions of optimal water supply and soil moisture deficit. The key enzymes of $C_4$-photosynthesis-PEP – carboxylase and NADP-malate dehydrogenase were established to be more stable in amaranth leaves under conditions of water stress than the Calvin cycle enzymes. However in wheat leaves Calvin cycle enzymes- RBP-carboxylase and carbonic anhydrase were more stable under water stress in comparison with the $C_4$-enzymes.